



**Ana Rita de Sousa  
Caldas**

**Polimorfismo do intrão 4 da eNOS e Doença  
Coronária**



**Ana Rita de Sousa  
Caldas**

**Polimorfismo do intrão 4 da eNOS e Doença  
Coronária**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Dr. António Correia, Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Dra. Susana Magadán, Professora Coordenadora sem agregação do Instituto Superior de Saúde do Alto Ave.

Dedico este trabalho aos meus pais por terem acreditado, sempre, em mim.

## **O júri**

Presidente: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Abreu Silva, professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogais: Prof. Doutor António Carlos Matias Correia, professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (co-orientador)

Prof.<sup>a</sup> Doutora Susana Magadán Mompó, professora adjunta do Instituto Superior de Saúde do Alto do Ave (orientador)

Prof.<sup>a</sup> Doutora Virgília Sofia Silva, investigadora de pós-doutoramento do laboratório associado CESAM, Universidade de Aveiro (arguente)

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado com a colaboração de algumas pessoas e participação de algumas instituições. Por esse motivo, tenho de expressar o meu agradecimento a todas elas, pela sua importância na execução do mesmo.

À Dra. Susana Magadán, pela sua orientação, ajuda e dedicação como orientadora.

Ao Dr. António Correia pelo seu apoio e motivação.

À Dra. Dianne Catalão pela sua amizade, companheirismo, ajuda e motivação.

À Dra. Alexandra Pinto pela amizade de sempre, incentivo e ajuda.

À Dra. Adriana Duarte pela ajuda durante a execução do trabalho.

Ao Paulo Costa, por toda a dedicação e apoio, nos momentos certos.

Ao serviço de Cardiologia do Centro Hospitalar do Alto Ave.

Ao serviço de Imunohemoterapia do Centro Hospitalar do Alto Ave.

Ao Instituto Superior de Saúde do Alto Ave (ISAVE).

## Palavras-chave

Óxido nítrico, óxido nítrico sintetase endotelial, doença arterial coronária, polimorfismo do intrão 4

## Resumo

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, inorgânico, gasoso e incolor tendo um electrão desemparelhado, tornando-o num agente tóxico. Este radical é sintetizado a partir da L-arginina envolvendo as óxido nítrico sintetases, constitutiva e induzível. Desempenha algumas funções intracelulares como o vasorelaxamento, a regeneração endotelial, a inibição dos leucócitos e plaquetas e a proliferação de células musculares lisas.

A Doença arterial coronária (DAC) é a maior causa de morbilidade e mortalidade em países desenvolvidos, esta doença é dependente de factores genéticos e ambientais. A aterosclerose envolve vários processos que culminam no desenvolvimento de uma lesão do vaso e, consequentemente, na ruptura da placa de ateroma ou em eventos isquémicos.

O NO formado pelas óxido nítrico sintetases (eNOS) , no endotélio, mantém a vasodilatação e promove processos antitrombóticos, se a produção de NO falhar pode causar disfunção endotelial e acelerar a DAC. Os estudos efectuados sobre os polimorfismos da eNOS associados ao risco de DAC não são conclusivos, encontrando-se diferenças entre os trabalhos publicados.

No nosso trabalho, apresentam-se resultados preliminares sobre a associação do polimorfismo VNTR do intrão 4a/4b da eNOS com a DAC, na população portuguesa. Os resultados preliminares apresentados foram obtidos a partir, de 52 indivíduos com DAC e 29 indivíduos saudáveis, genotipados para o polimorfismo VNTR do intrão 4a/b através de uma PCR.

Encontraram-se diferentes resultados, sobre a influência do alelo 4a, nos doentes com DAC, estes resultados sugerem que o alelo 4a está associado à presença precoce de DAC (idade <45 anos), contudo não parece estar associado ao número de vasos lesados, independentemente da idade do doente. Para se obter alguma conclusão seria necessário realizarem-se mais estudos.

**keywords**

Nitric Oxide, endothelial nitric oxide synthase, coronary artery disease, polymorphism intron 4

**abstract**

Nitric oxide (NO), is an inorganic and incolor free radical gas containing one unpaired electron, that transform it in a potential toxic agent. This radical is produced from L-arginine involving constitutive and inducible NO synthases. NO has a number of intracellular effects that lead to vasorelaxation, endothelial regeneration, inhibition of leukocyte chemotaxis, smooth muscle cell proliferation, and platelet adhesion.

The coronary artery disease (CAD) is a major cause of morbidity and mortality in developed countries, this disease is dependent of genetic and environmental factor risks. Atherosclerotic involves a cascade of pathologic processes that culminate in vascular damage and finally plaque rupture and subsequent ischemic events.

NO, formed by endothelial constitutive nitric oxide synthase (eNOS) maintains endothelium-dependent vasodilatation and mediates an antithrombotic action, and if endothelial NO production failure can cause endothelial dysfunction and accelerate atherosclerotic CAD. The studies about the eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease are not conclusive, and we can find differences depending on works.

In our work are presented preliminary results about the association of the intron 4a/ 4b VNTR polymorphism with CAD, in portuguese population.

We presente preliminary results obtained from the analysis of 52 patients with DAC and 29 healthy people, who were genotyped for the intron 4b/a polymorphism of the eNOS gene by PCR. We find different results about the influence of 4a in patients soffering DAC, they suggest that the 4a is associated with the premature presence of disease (age < 45 years), however it does not seem to be associated to the number of injured vases, independently of the age of the patients. Therefore further studies are necessary to get some conclusions.

---

## Índice

<b>1. Introdução</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Óxido nítrico</b>	<b>8</b>
1.1.1. Biossíntese do óxido nítrico	10
1.1.2. Óxido Nítrico Sintetase	11
1.1.2.1. Óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS)	12
1.1.2.2. Óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS)	12
1.1.2.3. Óxido nítrico sintetase induzível (iNOS)	13
1.1.3. Inibidores da NOS	14
1.1.4. Mecanismo de acção das NOS	14
1.1.4.1. NO produzido pela eNOS	14
1.1.4.2. NO produzido pela nNOS	16
1.1.4.3. NO produzido pela iNOS	17
<b>1.2. Doença Arterial Coronária</b>	<b>18</b>
1.2.1. Parede arterial	20
1.2.2. Aterosclerose	21
1.2.2.1. Etapas da aterosclerose	23
1.2.3. Factores de risco aterosclerótico	25
1.2.3.1. Susceptibilidade genética individual e história familiar de doenças cardiovasculares e de outras doenças ateroscleróticas	27
<b>1.3. A NOS e a sua função cardiovascular</b>	<b>28</b>
<b>1.4. Óxido nítrico e a vasoprotecção</b>	<b>29</b>
<b>1.5. Polimorfismo</b>	<b>31</b>
1.5.1. Polimorfismo Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) da eNOS na doença arterial coronária	31
<b>2. Material e métodos</b>	<b>34</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Análise do polimorfismo VNTR do intrão 4 da eNOS</b>	<b>37</b>
<b>4. Discussão de resultados</b>	<b>42</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>46</b>

## Anexo



---

## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Síntese do Óxido Nítrico	<b>11</b>
<b>Figura 2-</b> Via de síntese de NO	<b>16</b>
<b>Figura 3-</b> Visão anterior das artérias coronárias.	<b>19</b>
<b>Figura 4-</b> Corte longitudinal de uma artéria (vermelho) e de uma veia (azul) mostrando as estruturas das suas paredes.	<b>21</b>
<b>Figura 5-</b> Aterogénese: Processo inflamatório	<b>22</b>
<b>Figura 6-</b> Formação e activação da lesão aterosclerótica	<b>23</b>
<b>Figura 7-</b> Formação da placa fibrosa	<b>24</b>
<b>Figura 8-</b> Formação da lesão aterosclerótica	<b>25</b>
<b>Figura 9-</b> Visualização de eletroforese, de produtos de PCR, em gel de agarose a 3%	<b>38</b>

---

## **Índice de gráficos**

**Gráfico 1** - Número de vasos lesados segundo o polimorfismo genético 4a/4b do intrão 4 do gene da eNOS

**40**

---

## **Índice de quadros**

<b>Quadro I -</b> Nomenclatura das NOSs e suas propriedades	<b>13</b>
<b>Quadro II -</b> Factores de risco aterosclerótico	<b>26</b>
<b>Quadro III-</b> Características da predisposição genética à doença arterial coronária	<b>28</b>

---

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela I</b> - Relação entre os factores de risco e faixas etárias em indivíduos com Doença Arterial Coronária.	<b>37</b>
<b>Tabela II</b> – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo 4a/4b do gene da eNOS	<b>39</b>
<b>Tabela III</b> – Distribuição genotípica do polimorfismo VNTR 4a/4b do gene eNOS em indivíduos com DCC	<b>40</b>

---

## **Lista de abreviaturas**

**Ca<sup>2+</sup>**- Cálcio

**c-NOS** - Óxido nítrico sintetase constitutiva

**DAC** - Doença Arterial coronária

**DNA**- do ingles, Desoxyribonucleic acid

**EDRF**- do ingles, Endothelial- derivated relaxing factor

**eNOS** - Óxido nítrico sintetase endotelial

**E.P.E.** - Entidade pública empresarial

**GC** - Guanilato ciclase solúvel

**GMPc** - Guanosina monofosfato cíclico

**GTP** - Guanosina trifosfato

**HO<sup>•</sup>** - Hidroxil

**ICAM** - Molécula de adesão intervascular

**IL** - Interleucinas

**IL-1** - Interleucina1

**iNOS** - Óxido nítrico sintetase induzível

**LDL** - do ingles, Low density lipoprotein

**L-NA** - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina

**L-NAA** - N<sup>G</sup>-amino-L-arginina

**L-Name** - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina- metil-éster

**L-NIO** - N-imino-etil-L-ornitina

**L-NMMA** - N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina

**LPS** - Lipopolissacarideos

**MCP-1** - Proteína quimiotática de monócitos

**NADPH** - Fosfato dinucleotídeo adeninanicotinamida

**NMDA** - N-metil-D-aspartato

**nNOS** - Óxido nítrico sintetase neuronal

**NO** - Óxido nítrico

**NOS** - Óxido nítrico sintetases

**O<sup>2-</sup>** - Superóxido

**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**pb** - Pares de base

---

**PCR** - do inglês, Polymerase Chain Reaction

**PGI<sub>2</sub>** - prostaciclina

**SOD** - Enzima Superóxido Dismutase

**TNF $\alpha$**  - do inglês, Tumor necrosis factor-alpha

**UV** - Ultravioleta

**VCAM-1** - Molécula da adesão da célula vascular

**VNTRs** - do inglês, Variable Number of Tandem Repeats

---

## 1. Introdução

Actualmente, considera-se o endotélio vascular como uma glândula endócrina capaz de sintetizar um conjunto de substâncias que têm um papel importante na homeostase vascular, na inflamação, na agregação plaquetária e na fibrinólise (Van JR et al, 1990; Wu KK et al, 1996).

As substâncias sintetizadas pelo endotélio são, entre outras, a endotelina, com acção vasoconstrictora, a prostaciclina, com acção antiaderente, o factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF- endothelial- derivated relaxing factor), com acção antiagregante, o factor activador de plaquetas, as interleucinas (IL) e alguns factores de crescimento (Van JR et al, 1990; Rubanyi GM, 1991). Após vários estudos, foi demonstrado que o EDRF era o radical livre, óxido nítrico (Ignarro, 1987; Palmer et al, 1987; Moncada et al, 1991).

O óxido nítrico (NO), é um gás radical livre, amplamente estudado em reacções atmosféricas e processos industriais, pois é um gás potencialmente tóxico, incolor e poluente, mas só nas últimas décadas tem sido estudada a importância do NO nos organismos vivos (Moncada et al, 1991).

Nos últimos anos, o interesse em torno do óxido nítrico tem vindo a aumentar, a partir do momento em que se constatou, que baixas ou altas concentrações de óxido nítrico, presentes no organismo, estavam relacionadas com problemas cardiovasculares e cerebrais, assim como, com doenças inflamatórias (Granik VG et al, 1997).

### 1.1. Óxido nítrico

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, com uma semi-vida curta, de apenas alguns segundos, *in vivo*, devido à sua rápida oxidação em nitrito e nitrato (Snyder et al, 1992). Por ter, na sua constituição, um electrão desemparelhado (Beckman et al, 1996), torna-se um agente químico altamente reactivo sendo, até meados de 1980, apenas considerado um poluente ambiental com potencial carcinogénico (James SL, 1995). Actualmente, é um importante mediador de processos intra e extra celulares (Dusse et al, 2003).

---

Sendo uma das menores, mais simples e versáteis moléculas, produzidas pelo organismo (Morris et al, 1994), está associada a importantes funções fisiológicas como a vasodilatação, actividade citotóxica do sistema imune, neurotransmissão central e periférica, inibição da adesão e agregação plaquetárias (Moncada et al, 1991; Ignarro et al, 2002; Huynh et al, 2006).

Nos últimos anos, o NO tem sido alvo de diversos estudos, dada a quantidade de processos biológicos em que está envolvido, a primeira linha de investigação convergiu para o papel do NO e do endotélio no processo de relaxamento vascular, a segunda linha de investigação concentrou-se na produção de óxidos de nitrogénio no organismo e, mais tarde, a última linha de investigação estudou o mecanismo da acção dos neurotransmissores. Tendo as três linhas de investigação, um ponto em comum, e envolvimento do NO no estudo em questão (Ignarro, 1987; Palmer et al, 1987; Moncada et al, 1991).

Na década de 80, o interesse pelas funções fisiológicas do NO aumentou. A primeira linha de investigação teve origem nas conclusões de Furchgott e Zawadzki, 1980, ao comprovarem que a acção de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era dependente de um endotélio intacto, e envolvia a libertação de um EDRF. Mais tarde, chegou-se à conclusão de que o EDRF era o NO, através de estudos da acção biológica dos vasos (Ignarro, 1987; Palmer et al, 1987; Moncada et al, 1991) e das plaquetas (Radomski, 1987). Considerando-se o NO, exógeno e endógeno, muito importante no processo de relaxamento vascular (Katsuki et al, 1977, Rapoport e Murad, 1987).

Conclui-se então que o NO é um vasodilatador que provoca a dilatação das artérias coronárias (Katsuki et al, 1977) tendo outras funções como, inibir a agregação e adesão plaquetárias, a proliferação das células musculares lisas por cessação dos factores de crescimento, e diminuir ainda a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (Cooke JP et al, 1997).

A segunda linha de investigação concentrou-se na produção de óxidos de nitrogénio, nitratos e nitritos, no organismo, após se demonstrar que a quantidade ingerida era inferior à quantidade eliminada pelo organismo (Schmidt e Walter, 1994). Hibbs et al, 1987, clarificaram a origem do NO<sup>3-</sup> (nitrato) comprovando que a L-arginina era o



---

aminoácido essencial para a sua síntese. Foram estudados os mecanismos envolvidos nas reacções citotóxicas, mediadas por macrófagos, verificando-se que, a actividade destes eram dependentes da L-arginina e inibidas pelo seu análogo  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA). Palmer et al, 1988, conseguiram demonstrar que a L-arginina era o aminoácido necessário para a síntese de NO pelas células endoteliais. Após esta informação, vários investigadores estudaram a possibilidade de o NO ser o provável precursor da síntese de  $\text{NO}^3^-$  e  $\text{NO}^{2-}$ , em macrófagos. Comprovou-se, mais tarde, que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes activadas, sendo uma molécula reguladora. (Hibbs JR et al, 1988; Marletta MA et al, 1988)

A última linha de investigação está associada ao estudo do mecanismo da acção dos neurotransmissores. Em 1989, foi confirmada a síntese de NO pelo sistema nervoso (Bredt et al, 1989; Knowles et al, 1989) e demonstrou-se que o glutamato é o intermediário da libertação de NO por receptores, estimulados, N-metil-D-aspartato (NMDA) (Garthwaite et al, 1989).

Foi, também, descoberto que o NO é o activador endógeno da guanilato ciclase solúvel (GC), originando a formação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), funcionando como segundo mensageiro em células, tais como, nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas. O NO possui várias propriedades iguais ao  $\text{O}_2$  em particular, a sua alta afinidade pelo grupo heme, tendo importância na activação da guanilato ciclase (Feldman et al, 1993; Moncada e Higgs, 1993; Range et al, 2001).

### **1.1.1. Biossíntese do óxido nítrico**

A síntese de óxido nítrico (Figura 1) resulta da oxidação de um dos dois nitrogénios do grupo guanidino terminal da L-arginina, sendo esta reacção catalizada por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintetases (NOS) (Moncada et al, 1991; Marletta, 1993), convertendo a L-arginina em L-citrulina e NO. Os substratos utilizados por esta enzima são o aminoácido L-arginina, o oxigénio e o o fosfato dinucleotídeo adeninanicotinamida (NADPH) (Moncada e Higgs, 1991; Lane P et al, 1999).

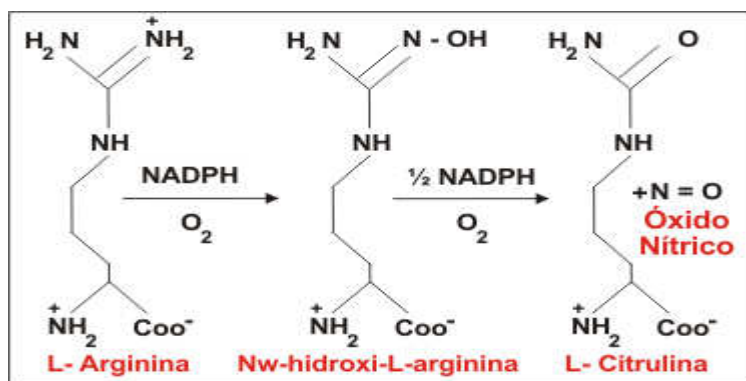


Figura 1- Síntese do Óxido Nítrico (Marletta MA, 1993)

### 1.1.2. Óxido Nítrico Sintetase

Em 1990, foi isolada e purificada uma enzima responsável pela formação do NO, a óxido nítrico sintetase (NOS). Existem três isoformas desta enzima, as quais são altamente homólogas na sua estrutura primária (Govers R et al, 2001) sendo, estas classificadas como, tipo I ou neuronal (nNOS), tipo II ou induzível (iNOS) e tipo III ou endotelial (eNOS) (Moncada et al, 1991; Lane et al, 1999). Estas isoformas são agrupadas em duas categorias, a NOS induzível (iNOS) e a NOS constitutiva (c-NOS). Esta última é constituída pela nNOS e eNOS, sendo a sua actividade, regulada pelo cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular e pela proteína associada ao Ca<sup>2+</sup>, a calmodulina, proteína de baixo peso molecular, que funciona como co-factor para activar a NOS (Marletta, 1994; Lane et al, 1999; Mendes-Ribeiro et al, 2001). O aumento do fluxo de cálcio para o espaço intracelular, leva a que o cálcio e a calmodulina se liguem à NOS activando-a, originando assim a L-citrulina e o NO, a partir da L-arginina (Moncada e Higgs, 1993). Já a iNOS, é Ca<sup>2+</sup> e calmodulina independente, podendo ser induzida em macrófagos e outras células activadas por diferentes citocinas, produzindo uma maior quantidade de NO por um período de tempo mais longo (Marletta, 1994; Lane et al, 1999; Mendes-Ribeiro et al, 2001).

Quanto à expressão das diferentes isoformas, a nNOS está presente, normalmente, nos neurónios (Bredt et al, 1989; Knowles, 1989) e a eNOS está presente, normalmente, nas células endoteliais vasculares (Moncada et al, 1991) e nas plaquetas (Radomski et al, 1990). A isoforma iNOS, não aparece sob condições normais sendo induzida por citocinas numa grande variedade de células desde macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos e plaquetas (Moncada et al, 1991). Está descrita a presença de três

---

diferentes genes que codificam as três isoenzimas nNOS, iNOS e eNOS que se encontram nos cromossomas 12, 17 e 7, respectivamente, (Marsden et al, 1993; Moncada et al, 1993; Xu W et al, 1993), e assim foram nomeadas, com base nos tecidos nos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas (Ress et al, 1989; Cooke et al, 1997).

As duas categorias de isoformas das NOS (c-NOS e i-NOS) são diferentes (Quadro I) quanto ao seu peso molecular, à forma de activação e à capacidade de síntese do NO (Marletta, 1994). A i-NOS requer algumas horas para ser expressa, mas após ser sintetizada, produz uma maior quantidade de NO e a sua síntese só acaba quando a L-arginina ou os co-factores necessários para a sua síntese forem destruídos ou, ainda, quando ocorre a morte celular (Dusting et al, 1995). A c-NOS sintetiza pequenas quantidades de NO, na ordem de nano ou picomoles, e a sua síntese depende da interacção com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes (Moncada et al, 1991; Marletta, 1994).

#### **1.1.2.1. Óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS)**

O papel do NO na regulação do tónus vascular e da função plaquetária é associado à actividade da isoforma eNOS. A sua inactivação limita a contribuição do NO na homeostase dos vasos, e resulta no aumento do tónus vascular, assim, como na adesão e agregação plaquetárias. A actividade da eNOS é controlada pela concentração de cálcio livre intracelular e pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. A eNOS está localizada no Complexo de Golgi, assim, como em estruturas específicas da membrana da célula. A associação da eNOS a uma região da membrana plasmática, vai ter reflexo na actividade enzimática, bem como, na acessibilidade aos processos intracelulares existentes para a síntese de NO, incluindo processos não associados ao aumento do cálcio intracelular (Wang y et al, 1995; Fleming et al, 1999).

#### **1.1.2.2. Óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS)**

Esta isoforma está localizada nas células neuronais centrais e periféricas e em células epiteliais. A sua actividade é regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina. Tem como funções a regulação da transmissão sináptica no sistema nervoso central, regulação da pressão sanguínea, relaxamento da musculatura lisa, vasodilatação através dos nervos periféricos

e está envolvida também na morte de neurónios no acidente vascular cerebral (Forstermann et al, 1994).

### 1.1.2.3. Óxido nítrico sintetase induzível (iNOS)

Esta enzima, não é expressa sob condições normais, estando localizada em diferentes células, incluindo macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, manifestando-se após estimulação com lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas (como IL-1 $\beta$ , TFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6). Tem um importante papel em actividades antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas (Forstermann et al, 1995). Esta isoforma não é dependente do cálcio, produz grande quantidade de NO, que tem efeito citostático nas células alvo, através da inibição de enzimas férricas, causando fragmentação do ácido dextrirribonucleico (DNA-Deoxyribonucleic acid). A indução da iNOS está envolvida em patologias auto-imunes e choque séptico (Forstermann et al, 1994)

Quadro I - Nomenclatura das NOSs e suas propriedades.

		Enzimas		
		NOS endotelial	NOS neuronal	NOS induzida
Propriedades	Nomenclaturas	eNOS, ecNOS, cNOS, NOS III ou NOS3	bNOS(brain), NOS I ou NOS1	iNOS, NOS II ou NOS2
	Localização	Endotélio vascular, plaquetas	Sistema Nervoso Central e Periférico, Epitélio	Macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso, hepatócitos
	Expressão	Constitutiva	Constitutiva	Induzível
	Regulação	Ca <sup>+</sup> /Calmodulina	Ca <sup>+</sup> /Calmodulina	Induzida por citocinas e endotoxinas
	Dependentes de Ca <sup>++</sup>	Sim	Sim	Não
	Cromossoma	7	12	17
	Peso molecular	133-135 KDa	150-160 KDa	125-135 KDa
	Síntese de NO	Baixa	Baixa	Alta

---

### **1.1.3. Inibidores da NOS**

Todas as isoformas da NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), N<sup>G</sup>-amino-L-arginina (L-NAA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina- metil-éster (L-Name), que competem com a L-arginina e agem como inibidores estéreo-específicos da NOS (Rees et al, 1990; Moncada et al, 1991). Para além destes existe a aminoguanidina, que inibe a NOS, mas com uma maior afinidade para a iNOS (Szabó C, 1995). Todos estes inibidores têm vindo a ser utilizados em estudos sobre a função do NO.

### **1.1.4. Mecanismo de acção das NOS**

#### **1.1.4.1. NO produzido pela eNOS**

Existem três tipos de músculos, de acordo com a sua estrutura, propriedades de contracção e mecanismos de controlo, o músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso. Os músculos lisos involuntários envolvem a parede dos órgãos ocos. Murad e colaboradores sugeriram, no início da década de oitenta, que a activação da enzima GC e a conversão de Guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP), através de mensageiros químicos, iriam actuar directamente nas células musculares do sistema vascular originando o seu relaxamento. Em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram que os mensageiros químicos actuavam nas células endoteliais, que revestem o interior do vaso, sendo responsáveis pela dilatação dos mesmos. Em reacção ao estímulo do mensageiro químico, o endotélio produz uma molécula, EDRF, que se difunde pelas células musculares situadas sobre ele, levando ao seu relaxamento. Em 1988, Furchott e Ignarro sugeriram que o EDRF e o NO eram a mesma molécula. Vários estudos foram realizados para mostrar que as células endoteliais libertam NO (Lancaster JR, 1992).

A síntese de NO (Figura 2) promove o relaxamento do músculo liso o que origina acções fisiológicas como a vaso e broncodilatação. Esta síntese ocorre quando os receptores, da membrana das células endoteliais, são activados por estímulos solúveis (como a acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina, ...) ou quando

---

aumenta o atrito provocado por células circulantes sobre o endotélio, originando a activação da eNOS presente nestas células e a consequente síntese de NO (Busconi et al, 1993). A eNOS encontra-se na membrana da célula endotelial, o que promove a presença de NO próximo ao músculo da vasculatura e às células sanguíneas circulantes, permitindo uma difusão rápida para a célula muscular, não necessitando nem de canais nem de transportadores específicos (Moncada e Higgs, 1993), e para o lúmen vascular (Michel T et al, 1993).

Esta rápida difusão e a sua facilidade em se introduzir noutras células devem-se ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica (Moncada et al, 1991). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima GC, alterando-a para a sua forma activa (GCa). Esta catalisa a saída de fosfato da molécula GTP, formando GMPC que promove o relaxamento da célula muscular, o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, levando ao aumento do fluxo sanguíneo e redução da pressão arterial (Moncada e Higgs, 1993). O relaxamento da célula muscular envolve o aumento da concentração de GMPC, a diminuição da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , a inibição da libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  e o aumento da retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático (Gewaltig et al, 2002). O mecanismo da remoção de NO da GC após ocorrer a vasodilatação necessária é desconhecido, sendo a produção de GMPC interrompida após a remoção do NO da enzima GC (Beckman et al, 1996). O sistema GC-GMPC tem um papel importante na acção fisiológica do NO (Lenhinger AL, 1986; Snyder et al, 1992).

A superfície íntima do endotélio vascular intacto, é anticoagulante e antitrombótica, e sintetiza várias moléculas importantes para a regulação da função plaquetária e da coagulação sanguínea. A interacção das plaquetas com as células endoteliais em locais de lesão endotelial assegura a secreção de mediadores, como o NO que previnem, o desenvolvimento intavascular do trombo. O NO presente no lúmen vascular pode entrar nas plaquetas, principalmente nas que se encontram junto à parede do vaso, ou nas hemácias. No interior das plaquetas, de forma idêntica ao que acontece na célula muscular, o NO promove o aumento de GMPC, logo diminui o  $\text{Ca}^{2+}$  livre, como a presença deste é importante para a activação plaquetária, este processo vai estar inibido (Wolin MS, 2000). As plaquetas humanas contêm eNOS logo também produzem NO. Todo o NO

produzido, tanto nas células endoteliais como endogenamente, é importante no controlo da função plaquetária (Radomski et al, 1990; Vasta et al, 1995).

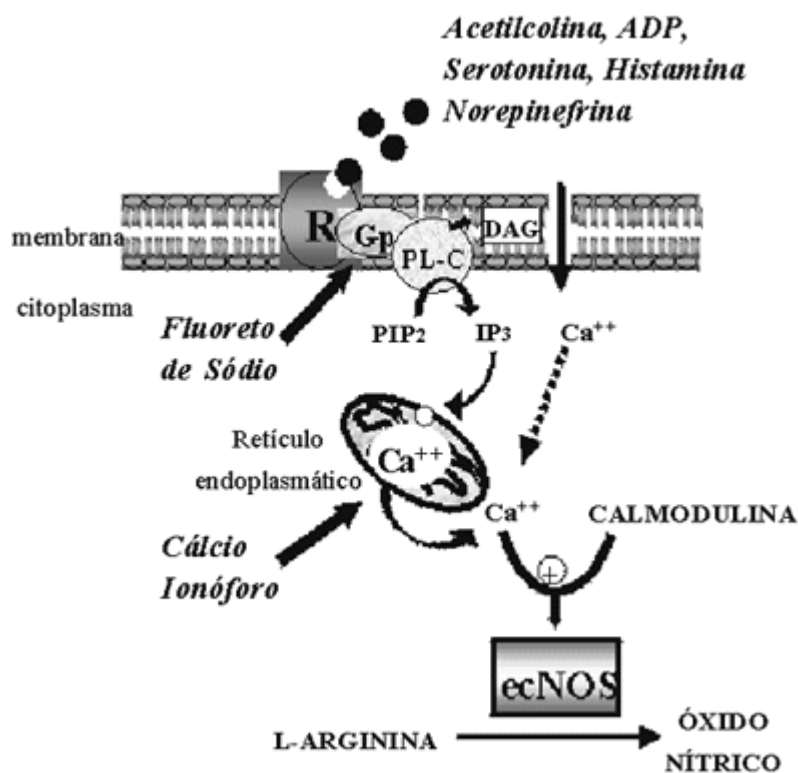


Figura 2- Via de síntese de NO (Fleming I, 1999)

#### 1.1.4.2. NO produzido pela nNOS

O sistema nervoso é formado por células nervosas que apresentam três partes fundamentais: o corpo celular, as dendrites e os axônios. Os estímulos nervosos obtidos pelas dendrites, seguem pelo corpo celular, percorrendo o axônio e, da extremidade deste passa para a célula seguinte. Os axônios de um neurónio estão separados das dendrites do neurónio seguinte por um espaço designado de espaço sináptico. Quando o impulso nervoso atinge a extremidade do axônio no espaço sináptico, a alteração eléctrica da membrana do axônio leva à libertação de substâncias químicas chamadas de neurotransmissores, que são intermediários, e encontram-se em vesículas especiais no espaço sináptico (Erhart EA, 1973; Mountcastle VB, 1974).

A produção neuronal de NO tem início num neurónio emissor (neurónio pré-sináptico) libertando um mensageiro químico, o glutamato, que se difunde no espaço sináptico ligando-se a um receptor específico o NMDA de um neurónio pós-sináptico. O receptor

---

NMDA é um receptor ionotrópico activado pelo ácido glutâmico (glutamato). A activação dos receptores de glutamato resulta na abertura de um canal iónico que não é selectivo para os catiões. Isso permite o fluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula, ligando-se à calmodulina, e da saída de  $\text{K}^+$  para fora da célula. O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina liga-se à NOS encontrada nas células nervosas, nNOS, activando a enzima que catalisa a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO. O NO recém sintetizado deixa posteriormente o neurónio por difusão directa da membrana da célula (Feldman et al, 1993).

Após muitos estudos realizados, verificou-se que o NO funciona muitas vezes como neurotransmissor, contudo não é idêntico a nenhum outro neurotransmissor conhecido. A maioria dos neurotransmissores ligam-se a receptores específicos da membrana da célula, o NO não necessita desses receptores específicos conseguindo penetrar na célula e difundir-se livremente pela mesma (Choi DW, 1993).

A função fisiológica exacta do NO, no cérebro, é controversa estando ainda a ser estudado o seu papel na formação de aprendizagem e na formação de memória a longo prazo. Estudos apresentados sugerem que o NO actua como um mensageiro retrógrado difundindo-se do neurónio pós-sináptico para o neurónio pré-sináptico, onde activa a enzima GC. Esta catalisa a reacção que produz GMPc, que desencadeia a libertação de glutamato e o ciclo repete-se. Esta repetição promove a aprendizagem e desenvolve a memória a longo prazo (Lancaster JR, 1992; Ainscough EW, 1995).

#### **1.1.4.3. NO produzido pela iNOS**

O NO que resulta da activação da iNOS possui acção citotóxica e citostática, destruindo microrganismos, células tumorais e parasitas. Durante o processo inflamatório a interacção do NO com outras substâncias dita a sua citotoxicidade. O NO para actuar de forma directa, do ponto de vista bioquímico, reage com metais, especialmente o ferro, presentes nas enzimas do seu alvo (James SL, 1995). Logo, são inactivadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de electrões, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular.

Células activadas, como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, em processos infecciosos, secretam NO e intermediários reactivos do oxigénio. A acção citotóxica indirecta do NO, consiste na sua reacção com esses intermediários do oxigénio. O no vai



---

reagir com outros radicais importantes, do ponto de vista biológico, como o anião superóxido ( $O_2^-$ ) resultando na formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante de proteínas. O  $ONOO^-$ , na presença de um íon de hidrogénio ( $H^+$ ), pode originar um radical altamente reactivo e tóxico, o hidroxil ( $HO^\cdot$ ), aumentando a acção tóxica do NO e do  $O_2^-$ . A célula produtora de NO não está a salvo desta toxicidade podendo ser destruída (Beckman et al, 1996).

Factos demonstram que o NO pode contribuir para algumas condições patológicas, onde os processos inflamatórios têm um papel muito importante, como asma, artrite, lesões ateroscleróticas, tuberculose, esclerose múltipla, Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (Bagasra et al, 1995; Buttery et al, 1996; Mannick et al, 1996).

## **1.2. Doença Arterial Coronária**

O coração, ao contrário do senso comum, não se nutre de todo o sangue que por ele passa até ser bombeado para todas as partes e tecidos do corpo. Ele possui duas artérias chave para sua irrigação, as artérias coronárias, a artéria coronária direita e a artéria coronária esquerda (Figura 3). Estas iniciam-se na base da artéria aorta e disseminam-se pelo coração. A maioria dos casos de enfarte agudo do miocárdio deve-se a obstruções nestas artérias (Guyton AC, 1984).

Depois de todo o sangue ser bombeado pelo ventrículo esquerdo para a artéria aorta, há um refluxo que não entra novamente para o coração porque assim que o sangue é ejectado, fecham-se as válvulas aórticas, encaminhando, então, o sangue do refluxo para as artérias coronárias que vão administrar o sangue ao músculo cardíaco (Hurst et al, 1981). O retorno venoso do coração é feito por três sistemas: Veias de Tebésio, Sistema venoso intermediário (Veias Cardíacas anteriores) e o Seio Coronário e suas Tributárias (Gray H, 1979).

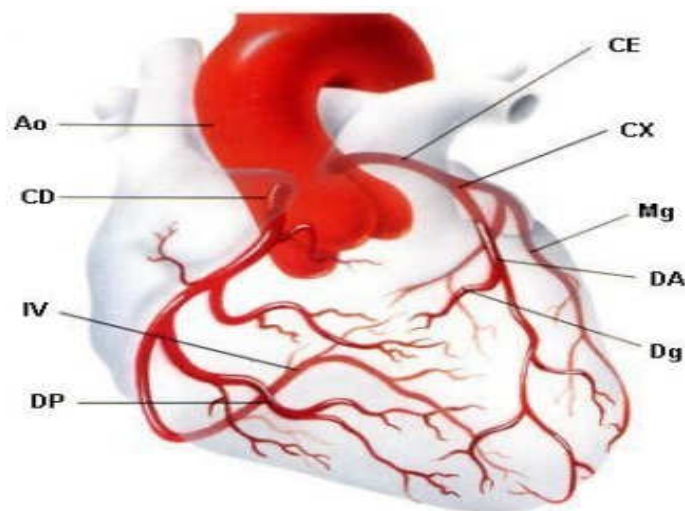


Figura 3 – Visão anterior das artérias coronárias. Ao – artéria aorta; CD – coronária direita; IV – ramo interventricular; DP – ramo descendente posterior; CE – coronária esquerda; CX – ramo circunflexo; Mg – ramo marginal; DA – ramo descendente anterior; Dg – ramo diagonal (Bristol-Myers-Squibb, Brasil).

As artérias coronárias principais localizam-se na superfície do coração e as pequenas artérias penetram dentro da massa muscular cardíaca.

A artéria coronária esquerda, divide-se na artéria descendente anterior e circunflexa e irriga principalmente a parte anterior do ventrículo esquerdo. A artéria coronária direita, divide-se na artéria descendente posterior direita e na artéria marginal aguda, irrigando a maioria do ventrículo direito, a aurícula direita, o nódulo sinoauricular, assim como a parte posterior do ventrículo esquerdo em 80 a 90% das pessoas. Em 50% dos seres humanos, o fluxo de sangue através da artéria coronária direita é maior que através da esquerda, porém, em 30% dos casos elas são quase iguais, e em apenas 20% a artéria esquerda predomina (Hurst et al, 1981).

Através do seio coronário sai a maior parte do sangue venoso proveniente do ventrículo esquerdo, o que representa sensivelmente 75% do fluxo sanguíneo coronário total. Portanto, a maior parte do sangue venoso proveniente do ventrículo direito flui através das pequenas veias cardíacas anteriores. Estas veias estão ligadas directamente para o interior do átrio direito, pois não estão conectadas com o seio coronário. Através das veias de Tebésio, uma pequena quantidade de sangue coronário entra novamente no coração;

---

estas veias drenam directamente para dentro de todos os compartimentos do coração (Hurst et al, 1981).

### **1.2.1. Parede arterial**

As doenças cardiovasculares resultam de um processo aterosclerótico que se desenvolve basicamente na parede arterial, originando a perda de elasticidade, formação das placas de ateroma e processos obstrutivos, o que origina a isquemia das regiões afectadas. Logo é necessário conhecer a anatomofisiologia da parede arterial para uma melhor compreensão da fisiopatologia destas doenças. Numa artéria sã existe uma clara estratificação dos seus diferentes constituintes. A parede arterial está formada por três camadas: a íntima, a média e a adventícia (Figura 4).

O endotélio é formado por uma camada de células endoteliais, que constituem uma barreira parcial e selectiva, tendo funções secretórias, sintéticas, metabólicas e imunológicas (Fishman AP, 1982). Separam a parede arterial do sangue que circula pelas mesmas, sendo semipermeável (Moncada S et al, 1977). Possui funções secretórias, sintéticas, metabólicas e imunológicas (Fishman AP, 1982). Imediatamente a seguir, ao endotélio, encontra-se a região subendotelial ou íntima arterial, um espaço acelular composto por componentes de matriz extracelular, como fibras de colagénio e elastina os quais são secretados por células do músculo liso. Seguidamente encontra-se a lâmina elástica interna que separa a íntima da média, uma região constituída por fibras elásticas mas maioritariamente por células da musculatura lisa, em proporção com o tipo de vaso arterial onde se encontra. Mais externamente encontra-se a adventícia constituída por tecido conjuntivo, fibroblastos e seus produtos (Stary et al, 1992).

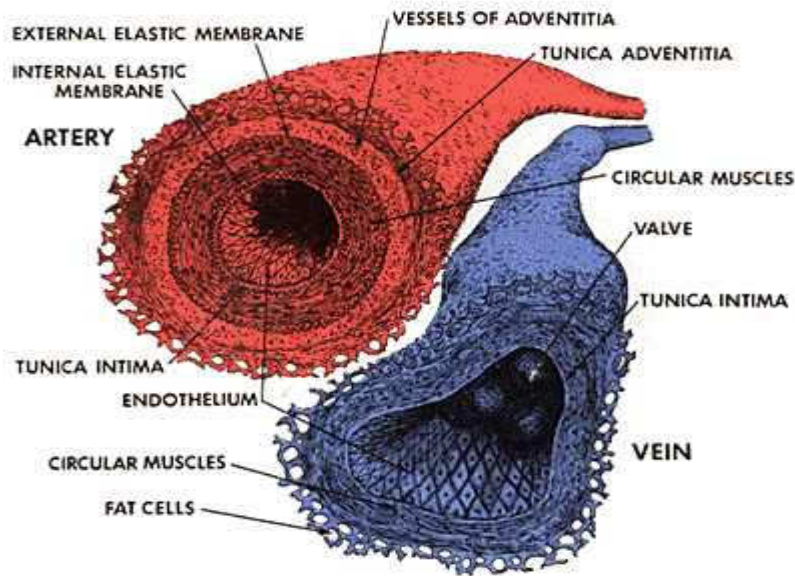


Figura 4 - Corte longitudinal de uma artéria (vermelho) e de uma veia (azul) mostrando as estruturas das suas paredes(Bristol-Myers-Squibb, Brasil).

### 1.2.2. Aterosclerose

Dado que as artérias coronárias administram o sangue ao músculo cardíaco, qualquer desordem de uma das artérias coronárias, pode ter graves consequências, pois a diminuição do fluxo de nutrientes e de oxigénio que chegam ao coração podem originar um ataque cardíaco e inclusive a morte. A aterosclerose (acumulação de placa de ateroma no revestimento interior de uma artéria que a vai bloqueando) é a forma mais frequente de doença cardíaca (Hurst et al, 1981).

A aterosclerose é uma doença multifactorial crónica, na qual as respostas inflamatórias interagem com factores metabólicos de risco que iniciam, propagam e activam lesões na artéria. A principal característica é o aumento da espessura da parede arterial devido à acumulação de lípidos e tecido conjuntivo, em porções variáveis, diminuindo assim o diâmetro do lúmen vascular (Ross, 1993; Beliner e Heincke, 1996; Ross, 1999).

É uma doença silenciosa e de progresso lento, sendo os sintomas a a sua evolução dependentes do lugar onde se desenrola a aterosclerose, podendo dar origem a eventos trombóticos, isquémicos e dependendo do órgão afectado, a morte do organismo (Ross, 1993).

Ao longo dos anos, vários estudos foram efectuados para explicar as bases moleculares e celulares da aterogénese, sendo todos de comum acordo que o metabolismo dos lípidos e lipoproteínas são necessários para o seu desenvolvimento.

A inflamação é um conceito basicamente molecular (Shepherd, 1997) e não se deve interpretar unicamente pela descrição efectuada por Virchow, em 1858, de calor, rubor, dor e mau funcionamento orgânico.

Os mediadores da inflamação como a TNF $\alpha$ , IL-1 e factor estimulante da produção de macrófagos aumentam a união de LDL (Low density lipoprotein) ao endotélio e músculo liso, aumentando assim a transcrição do gene do receptor de LDL. As LDL modificadas por oxidação estimulam o endotélio a produzir factor quimiotático de monócitos-1. Os monócitos entram na íntima e transformam-se em macrófagos, estes produzem citocinas inflamatórias como IL-1, e proteínas quimiotáticas de monócitos derivadas do endotélio que, por sua vez, vão reunir mais monócitos, podendo captar mais quantidade de LDL que, uma vez oxidadas são fagocitadas pelos monócitos/macrófagos os quais transformam-se em células espumosas (Figura 5). Este processo mantém o ciclo da inflamação e modificação das lipoproteínas (Franklin E, 1999; Ulf Landmesser MD et al, 2000).

As razões para uma grande variabilidade, na progressão da lesão, entre indivíduos com perfis lipídicos similares, no plasma, são desconhecidas (Williams e Tabas, 1995).

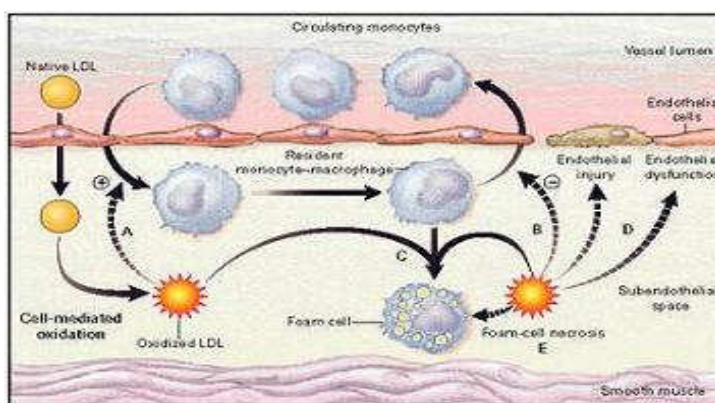


Figura 5 - Aterogénese: Processo inflamatório (Franklin Epstein, 1999)

### 1.2.2.1. Etapas da aterosclerose

Assim sendo, a placa de ateroma caracteriza-se pela acumulação progressiva de material gordo na íntima, conjuntamente, com o crescimento da camada muscular lisa e com a resposta inflamatória localizada através da participação dos linfócitos T e macrófagos (Ross, 1993; Ross, 1999).

A formação da placa de ateroma pode distinguir-se em três fases:

Na **primeira fase** (Figura 6) forma-se uma lesão aterosclerótica, visível, ligeiramente elevada, estreita e orientada longitudinalmente. Após a ocorrência da lesão as células endoteliais ficam afectadas e modificam a sua permeabilidade, o que facilita o acesso de macromoléculas ao subendotélio, entre elas, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL – Low density lipoprotein). Estas lesões contêm macrófagos derivados de monócitos presentes na corrente sanguínea, linfócitos T e macrófagos com depósitos intracelulares de lípidos (Stary, 1990; Ross, 1993; Beliner e Heinecke, 1996; Ross, 1999). As LDL, presentes no espaço sub-endotelial, vão ser oxidadas e reconhecidas pelos receptores “scavenger” dos monócitos/ macrófagos, causando a sua entrada e formação de células espumosas, caracterizadas pela presença de vesículas de gordura no citoplasma (Beliner e Heinecke, 1996; Ross, 1999).

Os lípidos presentes nestas células são esteres de colesterol e colesterol livre (Beliner e Heinecke, 1996).

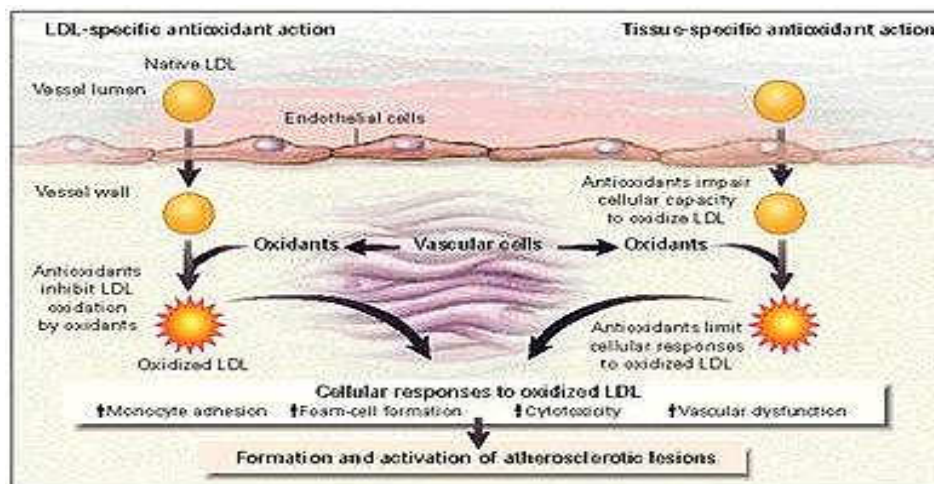


Figura 6 – Formação e activação da lesão aterosclerótica (Franklin Epstein, 1999)



---

A **segunda fase** (Figura 7) é a formação da placa fibrosa. Nesta fase, as interações são cada vez mais complexas. Uma maior quantidade de LDL penetra no endotélio, aumentando a captação de macrófagos, que por sua vez aumenta a quantidade de lípidos acumulados. As LDL oxidadas vão estimular as células endoteliais e estas, por sua vez, vão estimular as plaquetas que começam a sintetizar várias substâncias, entre elas, o factor de crescimento derivado das plaquetas. Este factor estimula a alteração fenotípica das células do músculo liso, alterando a sua fisiologia com a aquisição de novas propriedades como a migração, a proliferação e a secreção (Ross, 1993; Beliner e Heinecke, 1996; Ross, 1999).

As células musculares lisas deslocam-se até ao espaço subendotelial da íntima e produzem componentes da matriz extracelular como o colagénio, a elastina, as fibras elásticas, as fibronectinas, entre outras. Logo, as células musculares lisas vão rodear o depósito de gordura, mais concretamente as células espumosas ficando a placa de ateroma rodeada por uma capa fibrosa, à volta do núcleo de lípidos. As LDL oxidadas provocam a morte das células espumosas, podendo estas placas permanecer estáveis por muitos anos. Estas placas diminuem o lúmen da artéria, dependendo da quantidade de lípidos depositados assim como, da quantidade de células musculares lisas envolvidas (Ross, 1993; Beliner e Heinecke, 1996; Ross, 1999).

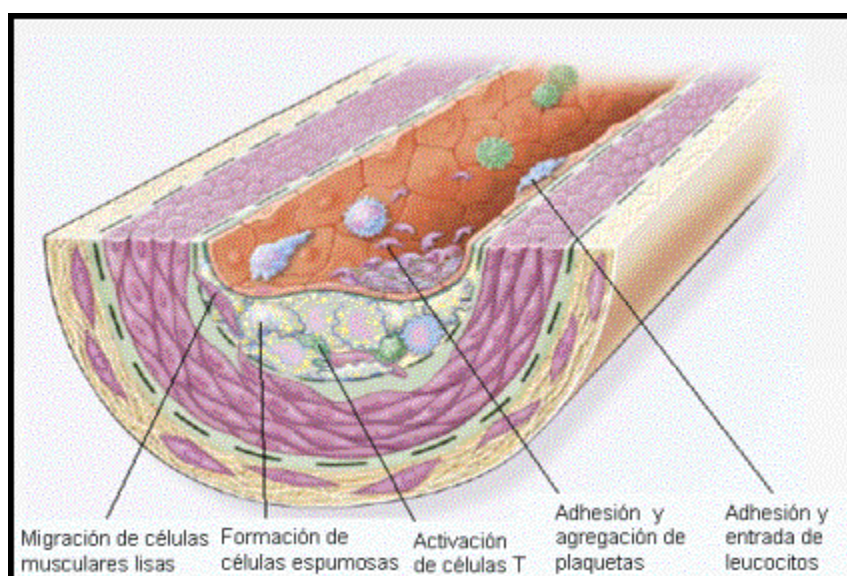


Figura 7 – Formação da placa fibrosa (Ross, 1999)

---

A **terceira fase** (Figura 8) consiste no momento em que a lesão aterosclerótica evolui para uma lesão mais complicada caracterizada por calcificação, necrose e ulceração. As LDL oxidadas, estimulam os monócitos e as células musculares lisas, levando à formação de metaloproteases e à diminuição da produção dos seus inibidores. Estimula também as células endoteliais para produzirem factor tecidual e diminuírem a síntese do inibidor do factor activador do plasminogénio. Por último, os lípidos das LDL oxidadas aceleram a agregação plaquetária (Ross, 1995; Beliner e Heinecke, 1996; Ross, 1999).

Frequentemente, ocorrem hemorragias quando a placa fibrosa deforma a arquitectura da parede arterial, fazendo com que pequenas artérias se rompam e sangrem podendo levar à calcificação. Na superfície da lesão podem formar-se trombos, sendo estes que originam a oclusão arterial (Ross, 1995; Beliner e Heinecke, 1996; Ross, 1999).

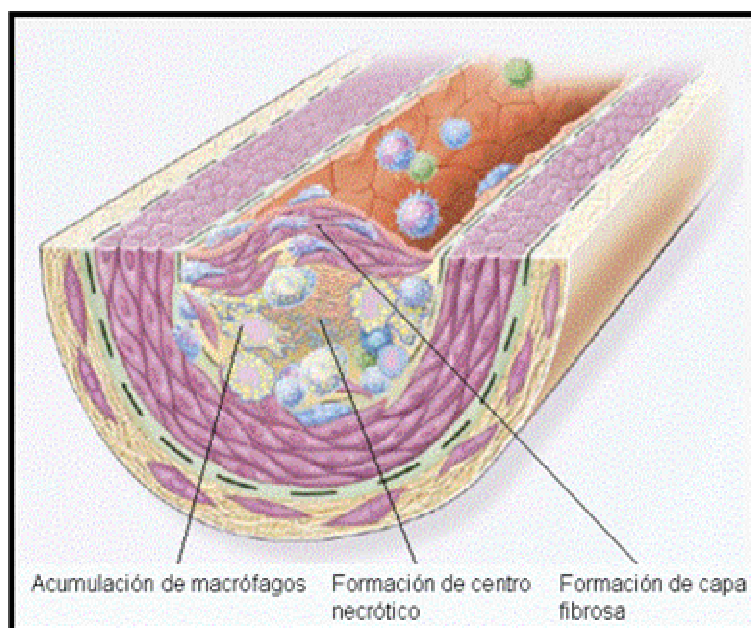


Figura 8- Formação da lesão aterosclerótica (Ross, 1999)

### 1.2.3. Factores de risco aterosclerótico

Consistem em características que desempenham um papel importante associado à probabilidade de desenvolver uma doença cardiovascular, num futuro mais ou menos próximo nos indivíduos que as apresentam (Pyörälä et al, 1994).



---

Quanto mais factores de risco, um individuo apresentar, maior serão as suas possibilidades de vir a desenvolver a doença. Existem factores que se podem tratar ou modificar, mas outros não (Quadro II). O controlo do maior número de factores de risco, através de mudanças do estilo de vida e/ou tratamentos precoces, pode reduzir e prevenir o risco de doença cardiovascular.

Entre os factores modificáveis, existe uma forte constatação que os estilos de vida associados à cultura ocidental (dietas ricas em calorias e gorduras saturadas, o tabagismo e o sedentarismo) têm um papel importante na ocorrência, em grande escala, de doenças cardiovasculares. Estes estilos de vida causam nos indivíduos alterações bioquímicas e fisiológicas originando a aterosclerose e os fenómenos trombóticos.

Por outro lado, existem os factores não modificáveis como, a idade, o sexo e a susceptibilidade genética individual e história familiar de doenças cardiovasculares e de outras doenças ateroscleróticas (Pyörälä et al, 1994).

Quadro II – Factores de risco aterosclerótico (Pyörälä et al, 1994)

<b>Factores modificáveis</b>	<b>Factores não modificáveis</b>
Dislipidemias	Idade
Tabagismo	Sexo
Inactividade física/Obesidade	Susceptibilidade genética individual e história familiar de doenças cardiovasculares e de outras doenças ateroscleróticas
Hipertensão arterial	
Hiperglicemia/Diabetes	

---

### **1.2.3.1. Susceptibilidade genética individual e história familiar de doenças cardiovasculares e de outras doenças ateroscleróticas**

A compreensão da base genética na doença arterial coronária (DAC) pode ajudar na sua prevenção. Vários processos bioquímicos estão abrangidos na formação e no desenvolvimento da aterosclerose, sendo estes, o metabolismo lipídico e o das apolipoproteínas, a resposta inflamatória, a função endotelial, a função plaquetária, a trombose, a fibrinólise, o metabolismo na homocisteína, a sensibilidade à insulina e a regulação da pressão arterial. Estes processos são constituídos por enzimas receptoras e ligandos, que são codificados pelos genes. Variações nos genes podem alterar as funções destes constituintes contribuindo, para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose em resposta aos factores de risco, à sua modificação e para o seu efeito no estilo de vida. A DAC é uma conjugação entre genes favoráveis, não favoráveis e factores ambientais. Quanto maior o numero de factores de risco, modificáveis e não modificáveis, associados a um individuo, maior a sua susceptibilidade para precocemente desenvolver aterosclerose (Edson A, 2002).

A detecção precoce da DAC pode levar a intervenções, mais precoces, em indivíduos geneticamente mais susceptíveis.

A susceptibilidade genética para esta doença pode ser avaliada por vários métodos que incluem testes com base em DNA, avaliação fenotípica de características bioquímicas, características físicas, assim como história pessoal e familiar. A história familiar positiva pode ser usada com um elevado grau de confiança no estudo de indivíduos que têm um risco aumentado de desenvolver DAC (Edson A, 2002). O Quadro III mostra as características da predisposição genética à doença arterial coronária.

---

Quadro III- Características da predisposição genética à doença arterial coronária (Edson A, 2002; Forstermann K et al, 2003)

Características da predisposição genética à doença arterial coronária
<ul style="list-style-type: none"><li>• Início precoce da coronariopatia (antes dos 45 anos)</li><li>• Lesão de múltiplos vasos</li><li>• Vários factores de risco modificáveis e não modificáveis</li><li>• História familiar de coronariopatia</li><li>• História familiar de doenças relacionadas como, diabetes, hipertensão, acidente vascular cerebral e desordens do metabolismo lipídico.</li></ul>

### 1.3. A NOS e a sua função cardiovascular

A grande parte da actividade da eNOS no coração é sintetizada no endotélio ao longo das artérias, veias e capilares dentro do miocárdio, encontrando-se também na camada endocárdica das cavidades cardíacas (Ursell PC et al, 1995). Esta isoforma da NOS está presente nas células endoteliais de aortas humanas normais, e em lesões ateroscleróticas. A expressão da eNOS em cortes seriados de vãos normais e ateroscleróticos, mostra que existe uma diminuição no número de células endoteliais expressando eNOs em lesões avançadas (Wilcox JN et al, 1997). A eNOS presente no coração vai inibir a contracção e proliferação das células da musculatura lisa existentes nos vasos sanguíneos, inibe a adesão de monócitos e a agregação plaquetária, induz o relaxamento diastólico e diminui o consumo de oxigénio no músculo cardíaco (Balligand JL e Cannon PJ, 1997). Estudos mostram que, na aterosclerose clinicamente relevante, a expressão da eNOS e a consequente libertação de NO estão significativamente diminuídos, o que sugere a progressão da aterosclerose (Oemar BS et al, 1998).

A nNOS e a iNOS não foram visualizadas em vasos normais, mas sim em vasos com lesões precoces e avançadas, associadas com macrófagos e células endoteliais (Wilcox JN et al, 1997).

A iNOS embora não exista no coração saudável, existe em macrófagos presentes em processos de remodelamento após vários tipos de lesões cardíacas. A expressão proteica da iNOS é induzida em todo o tipo de células após exposição a citocinas (Ursell PC et al,

---

1995; Balligand JL e Cannon PJ, 1997). Estas citocinas inflamatórias associadas com a aterosclerose podem ser capazes de estimular a produção e a actividade de iNOS, as quais podem favorecer as características patológicas da DAC. A severidade da lesão está relacionada com a expressão da iNOS (Behr D et al, 1999). As grandes quantidades de NO produzidas, moldam a depressão miocárdica, característica da estimulação do sistema imune e promovem a morte celular por apoptose (Balingand JL e Cannon PJ, 1997).

A nNOS tem uma menor importância no coração encontrando-se em terminações simpáticas normais tendo como função regular a libertação de catecolaminas no coração (Ursell PC et al, 1995; Balligand JL e Cannon PJ, 1997).

A aterosclerose está associada a alterações significativas na actividade das isoformas de NOS na parede arterial (Moncada e Higgs, 1993).

#### **1.4. Óxido nítrico e a vasoprotecção**

Em 1977, Moncada et al, publicaram que o endotélio tinha um papel importante no controlo do tónus vascular, através da síntese de substâncias vasoactivas. Em situações fisiológicas normais o endotélio mantém o tónus vascular reduzido, prevenindo a adesão de leucócitos e plaquetas e a proliferação de células musculares lisas (Ross, 1993), como referido anteriormente. A activação das células endoteliais, mediada pela aterosclerose, entre outros, origina alterações nas suas funções, dando origem à disfunção endotelial. Esta disfunção caracteriza-se por um desequilíbrio entre os factores pró-coagulantes e anticoagulantes, relaxantes e constritores e entre substâncias estimuladoras e inibidoras do crescimento e proliferação celular (Rubanyi GM, 1993). Desempenha um papel patogénico no progresso da aterosclerose, estando associada aos factores de risco que a predis põem, estando presente antes do comprometimento vascular, propriamente dito (McLenachan JM, 1990; Egashira K et al, 1993). Na disfunção endotelial, presente na aterosclerose, a acção da endotelina-1, potente vasoconstritor produzido pelo endotélio, sem a acção do óxido nítrico, promove vasoconstrição e proliferação das células musculares lisas (Lopez JA et al, 1990).

O NO resultante da eNOS tem um papel importante na vasoprotecção, estando esta acção associada à manutenção do tónus vascular através da libertação de quantidades mínimas

---

de NO sempre que existe um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial do vaso, resultando numa discreta vasodilatação (Weenmalm A, 1994). A pressão sanguínea contribui para regular a libertação de NO em condições fisiológicas, sabendo-se que a inibição de NO resulta num aumento drástico da pressão arterial (Nava et al, 1995). A eNOS inactivada por radicais livres, derivados de oxigénio, pode ser um importante factor para a formação da disfunção endotelial (Gryglewski RJ et al, 1986).

O NO, produzido em resposta à trombina, inibe as plaquetas e intervêm na coagulação sanguínea (Kubes P et al, 1991). Juntamente com a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), ambos libertados pelo endotélio, contribui para a prevenção da agregação e adesão plaquetárias (Wilcox JN, et al, 1997) através do aumento da GMPc e da diminuição do Ca<sup>2+</sup> intraplaquetário (Vasta V et al, 1995).

O NO participa na inibição da adesão dos monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, já que esta adesão tem um papel importante na patogénese da aterosclerose. Esta adesão, depende das selectinas e as citocinas (Kubes P et al, 1991) e da expressão de moléculas da superfície da célula endotelial como, a molécula da adesão da célula vascular (VCAM-1), a molécula de adesão intervascular (ICAM), e a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), que se encontram diminuídas na presença de NO nas células endoteliais e nas células do músculo liso (Wu L et al, 1999).

Tem como função, um efeito antiproliferativo, pois a proliferação das células do músculo do vaso tem um papel importante, no estreitamento do vaso sanguíneo. O factor de crescimento derivado das plaquetas funciona como um estímulo proliferativo, levando à perda da capacidade contráctil pelas células musculares que podem migrar para a íntima contribuindo para a sua hiperplasia. O mecanismo da actividade antiproliferativa do NO, produzido pelo endotélio vascular ou por doadores exógenos, ainda não é completamente conhecido (Gewaltig et al, 2002; Scott- Burden et al, 1993).

A toxicidade do NO está presente particularmente em situações de stress oxidativo, formação de intermediários de oxigénio e deficiência do sistema imune oxidante. O seu efeito antioxidativo previne doenças tromboembólicas derivadas do stress oxidativo, que podem ocorrer nos vasos sanguíneos. A enzima Superóxido Dismutase (SOD), induzida pelo NO formado pela eNOS na parede do vaso, vai diminuir o O<sub>2</sub> disponível

---

diminuindo também a produção de ONOO<sup>-</sup>. A síntese de ferritina vai aumentar, pela acção do NO, e vai ligar-se aos iões ferro livres e previne a formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Os macófagos presentes na placa de ateroma produzem O<sub>2</sub><sup>-</sup>, expressam a iNOS e produzem NO (Wolin MS, 2000).

## **1.5. Polimorfismo**

A variabilidade genética deve-se à presença de alterações genéticas herdadas. Um gene, localizado num *locus*, pode apresentar-se de diferentes formas devido a variações na sequência. Cada forma alternativa denomina-se de alelo e a sua percentagem na população denomina-se de frequência alélica. Quando um *locus* apresenta-se em, pelo menos, duas formas e a frequência alélica do alelo mais raro é de 1% ou maior, esse *locus* designa-se de *locus* polimórfico e essa variação denomina-se de polimorfismo (Villaverde FJ, 2006).

Muitos polimorfismos foram já estudados e apenas alguns deles acarretam consequências funcionais na síntese e actividade das proteínas que codificam, levando à alteração de importantes funções originando uma maior ou menor predisposição a doenças.

### **1.5.1. Polimorfismo Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)**

#### **da eNOS na doença coronária**

VNTRs são conjuntos de sequências de nucleotídeos repetidas (em tandem) que se encontram num único *locus* sendo o número de sequências repetidas variável entre indivíduos. Este polimorfismo é do tipo deleção/inserção.

O gene *NOS3* que codifica para a eNOS encontra-se localizado no cromossoma 7q35-36, constituído por 26 exões com 21 quilobases. Neste gene foram descritos alguns polimorfismos entre os quais o polimorfismo, VNTR do intrão 4 (Marsden et al, 1993; Nadaud et al, 1994).

Este polimorfismo está localizado no intrão 4 da eNOS (polimorfismo eNOS 4b/a) estando associado à concentração de NO no plasma. Na repetição de uma sequência de 27 pares de base (pb), foram estudados, dois alelos, um alelo grande comum e um alelo

---

menor. O alelo grande (alelo eNOS 4b) designado de b-inserção tem cinco repetições em tandem, e o alelo menor (alelo eNOS 4a) designado de a-delecção tem quatro repetições em tandem (Nadaud et al, 1994; Wang et al, 1997).

A informação disponível, até ao momento, da associação entre o polimorfismo do intrão 4 da eNOS e a doença coronária é controversa.

Alguns estudos indicam uma associação entre a homozigotia do alelo eNOS 4a e o risco de doença coronária (Wang et al, 1996), sendo considerado factor de risco independente do tabagismo para desenvolvimento da doença numa população em Itália (Fatini et al, 2004). Contudo outros investigadores não detectaram uma ligação entre este polimorfismo e a doença coronária. Matyar et al, 2005, demonstraram que a presença do alelo 4a não é independente para o desenvolvimento da doença, e que a presença de risco só é verificada quando associada a factores de risco modificáveis e não modificáveis.

---

## 2. Material e métodos

Este trabalho tem como objectivo verificar a incidência, do polimorfismo VNTR do intrão 4, da óxido nítrico sintetase endotelial na doença coronária, na população portuguesa.

Para amostra deste estudo foram seleccionados 52 doentes da consulta coronária do Centro Hospitalar do Alto Ave, E.P.E., aos quais foi efectuado um questionário (Anexo) apenas realizado após o consentimento informado dos doentes. Este questionário estava direccionado para a obtenção dos factores de risco do doente sendo estes, posteriormente, confirmados através do processo clínico. Todos estes doentes tiveram consulta e realizaram exames como angiografia, cateterismo cardíaco e coronariografia para confirmar a doença coronária, sabendo-se também o número e grau de vasos lesados. Como amostra normal foram seleccionados 29 pessoas com idades superiores a 65 anos da consulta de Trombose e Hemostase do Centro Hospitalar do Alto Ave, E.P.E., sem história de DAC. A escolha de pessoas idosas evita o estudo de indivíduos mais jovens que poderiam desenvolver a doença coronária mais tarde. Por se tratar de uma população muito idosa, a maioria das respostas eram duvidosas, não sendo possível validar o questionário através do processo clínico. Devido a este facto, a amostra foi só caracterizada pelo sexo e idade, não sendo possível inquirir e validar os restantes factores de risco.

Foi recolhido sangue periférico em EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) a todos os doentes, de ambas as consultas que constituem a amostra deste estudo. A todas as amostras de sangue periférico foi realizada a extracção de DNA genómico pela adaptação do método não enzimático, descrito por Debomoy K et al.

A quantificação e a qualidade do DNA extraído foi analisado através da execução de um gel de agarose a 0,8% com posterior comparação com padrão HyperLadder II (Bioline), constituído por pesos moleculares conhecidos.

A determinação do genótipo do polimorfismo VNTR do intrão 4 foi determinada através de uma PCR (Polymerase Chain Reaction), na qual se amplificaram dois fragmentos de 393 pb (correspondente ao alelo a) e 420 pb (correspondente ao alelo b) a partir de 100 ng de DNA genómico.



---

A mistura da reacção contém o DNA alvo, 10µg/ml de primers (SIGMA®), 1µl de DNA polimerase termoestável (Bioline®), e 10µg/ml de, desoxiribonucleosídeos trifosfatados, dNTPs (Bioline®). Na primeira etapa, ocorre a desnaturação, durante 5 minutos a 94°C, na segunda a amplificação do DNA, em 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto seguido de 56°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto, e na terceira a amplificação 10 minutos a 72°C. Os primers utilizados foram os 5'- AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3' e 5'- TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3', sense e antisense, respectivamente. A PCR das amostras foi efectuada no termociclador MyCycler da Biorad.

Os produtos amplificados são vistos através de uma eletroforese em gel de agarose a 3%. As dimensões dos produtos amplificados medem-se por comparação com padrões de peso molecular conhecidos, padrão HyperLadder II e são visualizados com o Brometo de etídio, num transiluminador, GelVue UV transilluminator, com lâmpada UV.

---

### 3. Resultados

O desenvolvimento da DAC pode ser consequência da alteração de vários genes, na maioria dos casos existe uma base genética multifactorial, envolvendo genes e factores modificáveis, que interagem entre eles, fazendo com que o indivíduo desenvolva ou não a doença. Os factores de risco, dos 52 indivíduos diagnosticados com DAC, deste estudo, estão representados na Tabela I.

Analisando os resultados desta tabela, observa-se que, 75% da amostra estudada são homens. Aproximadamente 77% apresentam dislipidémia e cerca de 40% apresenta história familiar de DAC, sendo de salientar que esta percentagem poderá na realidade ser superior uma vez que 34,6% dos indivíduos desconhece se tem antecedentes familiares. Ao analisar os dados, por faixas etárias (menores de 45, 45-65 e maiores de 65 anos de idade) em relação aos factores de risco, verifica-se que os dados obtidos são semelhantes no que respeita à hipertensão sendo a sua percentagem semelhante nas diferentes faixas etárias. A dislipidémia está presente de forma idêntica, aproximadamente 65%, antes dos 45 anos e depois dos 65 anos de idade, tendo uma maior predominância, 88,9%, entre os 45 e 65 anos de idade. A percentagem de indivíduos fumadores diminui substancialmente ao longo da idade e a percentagem de indivíduos diabéticos apresenta-se de forma irregular, manifestando-se em maior número, 44,4%, entre os 45 e 65 anos. Quanto á história familiar verifica-se que é inversamente proporcional à idade, havendo uma percentagem significativamente superior, 77,8%, nos indivíduos que desenvolveram a DAC antes dos 45 anos em comparação com os indivíduos com mais de 65 anos cuja percentagem é de 18,8%. O que confirma que, nos indivíduos idosos, a componente genética tem uma menor relevância no desenvolvimento da DAC.

Tabela I- Relação entre os factores de risco e faixas etárias em indivíduos com DAC

	Total N = 52	≤ 45 anos N= 9	>45 - < 65 N = 27	≥ 65 anos N = 16
<b>Idade Diagnóstico (X ± S.D.)</b>	58.2 ± 12.2	40 ± 4.4	56.3 ± 6.0	71.6 ± 5.8
<b>Homens (%)</b>	75	100	77,8	56,3
<b>Fumadores (%)</b>	51,9	88,9	59,3	18,8
<b>Hipertensão (%)</b>	63,4	55,6	66,7	62,5
<b>Diabetes (%)</b>	32,6	11,1	44,4	25
<b>Dislipidémia (%)</b>	76,9	66,7	88,9	62,5
<b>História Familiar</b>				
<b>Sim (%)</b>	40,3	77,8	55,6	18,8
<b>Não se conhece (%)</b>	34,6	0	29,6	62,4

### 3.1. Análise do polimorfismo VNTR do intrão 4 da eNOS

Para a determinação do genótipo do polimorfismo 4a/4b do intrão 4 do gene eNOS, executou-se uma PCR onde se amplificaram diferentes fragmentos, dependendo do polimorfismo detectado: no caso do alelo 4a, é amplificado um produto de 393pb, e para o alelo 4b um produto de 420pb. Como se verifica na Figura 9, os produtos são facilmente diferenciados quando submetidos a uma electroforese, em gel de agarose a 3%.

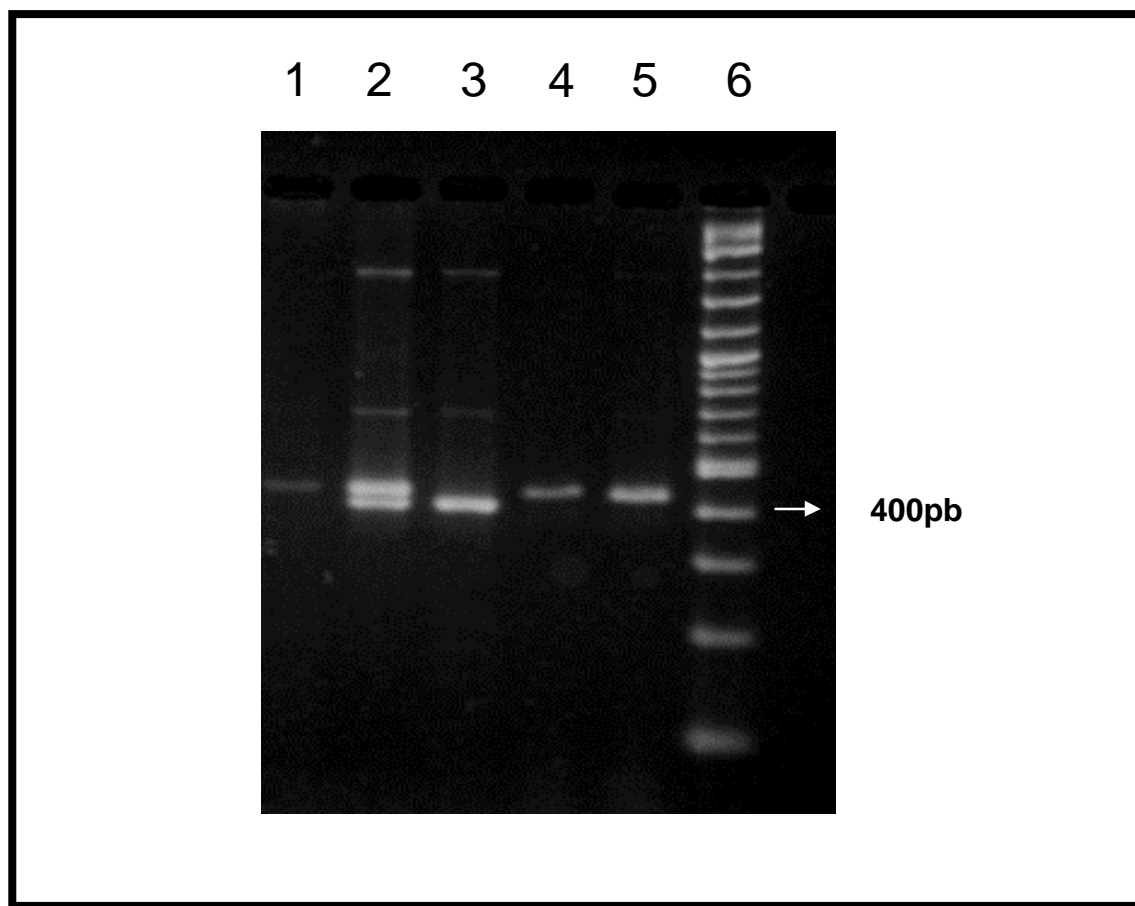


Figura 9 - Visualização de eletroforese, de produtos de PCR, em gel de agarose a 3%

- 1- Produto de PCR com 1 fragmento de 420pb, genótipo 4b/4b.
- 2- Produto de PCR com 2 fragmentos, um de 393pb e outro com 420pb, genótipo 4a/4b.
- 3- Produto de PCR com 1 fragmento de 393pb, genótipo 4a/4a
- 4- Produto de PCR com 1 fragmento de 420pb, genótipo 4b/4b
- 5- Produto de PCR com 1 fragmento de 420pb, genótipo 4b/4b.
- 6- Padrão HyperLadder II, fragmentos com pesos moleculares conhecidos

A distribuição genotípica do polimorfismo 4a/4b do gene eNOS e as suas frequências alélicas, nos 52 indivíduos com DAC e os 29 indivíduos sem história de DAC (amostra controle), está representada na Tabela II. Assim, em ambas as amostras, as frequências genotípicas e alélicas observadas são compatíveis com o equilíbrio Hardy-Weinberg, aceitando o modelo de herança recessiva para o alelo 4a. Embora a frequência dos genótipos 4b/4a e 4a/4a entre os doentes e controle aparentemente sejam diferentes, as frequências alélicas são quase idênticas. Para se chegar a uma conclusão, seria necessário

aumentar o número de indivíduos analisados e atingir um número de amostra estatisticamente significativa.

Tabela II: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo 4a/4b do gene da eNOS

	<b>Doentes</b> <b>N = 52</b>	<b>Controlo</b> <b>N= 29</b>
<b>eNOS (VNTR 4a/4b)</b>		
<b>4b4b (%)</b>	85	86
<b>4b4a(%)</b>	13	7
<b>4a4a(%)</b>	2	7
<b>Alelos</b>		
<b>4b (%)</b>	91.5	89.5
<b>4a (%)</b>	8.5	10.5

Outro aspecto a ter em conta, é que os factores genéticos podem ter uma grande influência no aparecimento precoce da DAC, pelo que as frequências fenotípicas do polimorfismo a estudar, nos doentes, podem variar dependendo da faixa etária. Como se pode observar, na tabela III, a proporção de homozigóticos, 4a/4a, é muito superior em indivíduos com idade inferior aos 45 anos, 11%, se o compararmos com os resultados obtidos em toda a amostra, 2%, ou com os resultados obtidos em indivíduos com idade superior aos 45 anos, 0%. Estas diferenças também estão presentes após a análise da frequência alélica, estando o alelo 4a presente em maior proporção nos indivíduos mais jovens. Estes resultados poderiam sugerir a associação do alelo 4a e/ou genótipo homozigótico com a doença coronária em indivíduos jovens. Embora estes resultados contrariem os dados obtidos nos indivíduos da amostra controlo (tabelaII), é de salientar o facto de o número da amostra ser pequeno, podendo justificar esta situação. Pelo facto do número de indivíduos, estudados, ser pequeno, a avaliação estatística das diferenças encontradas devem ser avaliadas no futuro.

Tabela III: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo VNTR 4a/4b do gene eNOS em indivíduos com DAC

	Total N = 52	≤ 45 anos N= 9	>45 - <65 N = 27	≥ 65 anos N = 16
<b>eNOS (VNTR 4a/4b)</b>				
<b>4b4b (%)</b>	85	67	89	87
<b>4b4a(%)</b>	13	22	11	13
<b>4a4a(%)</b>	2	11	0	0
<b>Alelos</b>				
<b>4b (%)</b>	91.5	78	94.5	93.5
<b>4a (%)</b>	8.5	22	5.5	6.5

Analizou-se também, a possível relação do polimorfismo do intrão 4 da eNOS com o número de vasos lesados identificados por cateterismo, angiografia e coronariografia. Esta análise foi efectuada a partir de 44 indivíduos com DAC. Como se mostra no gráfico 1, em que se apresenta a percentagem de indivíduos com 1 ou 2 vasos lesados ou com mais de 2, em relação ao polimorfismo, os indivíduos com o alelo 4b apresentam um maior número de vasos lesados.

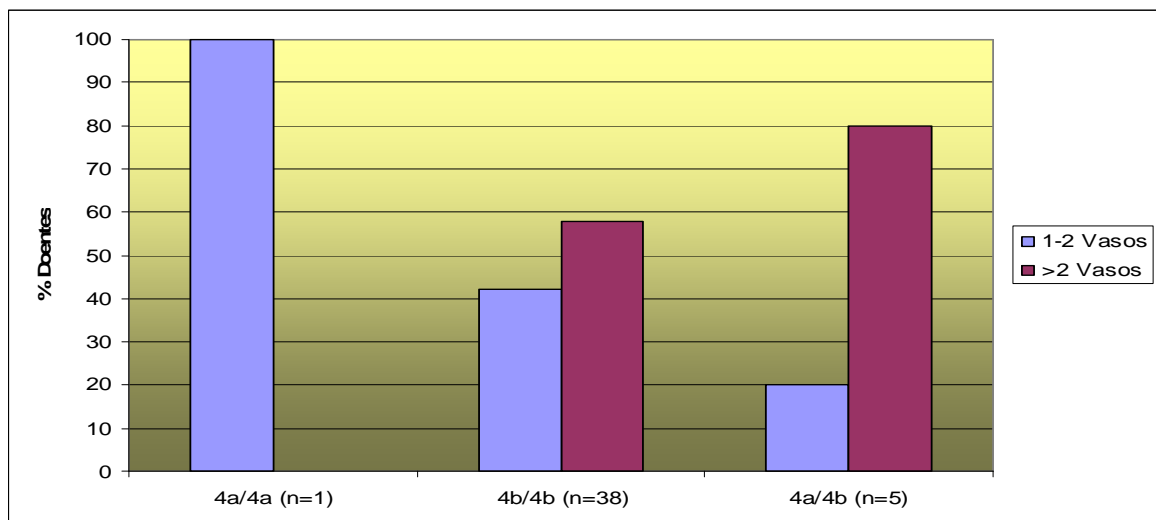


Gráfico 1- Número de vasos lesados segundo o polimorfismo genético 4a/4b do intrão 4 do gene da eNOS

---

## 4. Discussão de resultados

O óxido nítrico, continuamente secretado pelas células, tem um papel importante na vasodilatação, entre outros. A actividade vasodilatadora do óxido nítrico é devida a interacções com o átomo de ferro do grupo heme da GC, originando a sua activação e aumentando os níveis intracelulares de GMPc (Arnold WP et al, 1977). Nas células musculares lisas, isto reduz a concentração intracelular de cálcio e causa o relaxamento vascular (Loscalzo J, 1995).

O estudo da função arterial nos vasos, em humanos, é complicado por diversos factores, farmacológicos e físicos, que necessitam ser considerados para uma correcta interpretação de resultados. A DAC é uma doença multifactorial, sendo todos os factores de risco, modificáveis e não modificáveis importantes no seu desenvolvimento. Devido ao papel do óxido nítrico, vasodilatador, durante o desenvolvimento da placa de ateroma, a óxido nítrico sintetase tem especial importância no desenvolvimento da DAC (Yoon Y et al, 2000).

Um considerável número de estudos epidemiológicos do tipo caso-controlo para relacionar o desenvolvimento da aterosclerose e o genótipo com a quantidade de eNOS expressa, assim como, de avaliação entre os polimorfismos da eNOS e DAC, têm sido descritos. Os polimorfismos do gene da eNOS associados à DAC, mais estudados são o VNTR intrão 4, o T-786C e o G894T. No intrão 4 do gene eNOS é identificado um polimorfismo repetido, o alelo maior, eNOS4b, contém cinco sequências de 27 pb repetidas em tandem e o alelo menor, eNOS4a, tem apenas quatro repetições (Yashimura M et al, 1998).

A associação entre fumadores e o alelo eNOS4a em pacientes com DAC foram descritas por Wang et al, 1996. Mais tarde, um estudo realizado numa amostra japonesa, concluiu que o alelo eNOS4a era um factor de risco independente, para o desenvolvimento da doença, não se observando diferenças entre fumadores e não fumadores (Ichihara S et al, 1998), por sua vez, outros estudos, alemão e tailandês, não encontraram nenhuma associação entre este polimorfismo e a DAC (Sigush HH et al, 2002; Hwang JJ et al, 2002). Recentes estudos associam o polimorfismo VNTR do intrão4 da eNOS à disfunção endotelial (Li R et al, 2004) e vascular (Fatini C et al, 2004), demonstrando a sua

---

importância. Estas discrepâncias de resultados entre diferentes trabalhos podem ter diversas explicações como, o tamanho das amostras estudadas, diferentes critérios na selecção das amostras, a etnia, e os factores de riscomodificáveis, entre outros.

Um dos problemas neste tipo de estudos é a escolha do grupo controlo, assim nos trabalhos consultados o grupo controlo é constituído por indivíduos considerados saudáveis, com a mesma idade, sexo e peso, que não apresentam factores de risco modificáveis. Mas não é avaliada, directamente, a existência de vasos lesados. Assim, no nosso estudo foram utilizados como grupo controlo indivíduos idosos (> de 65 anos) a quem nunca foi diagnosticada a DAC, de modo que, a possível existência de vasos lesados fica mais relacionada com o envelhecimento normal, não patológico, do próprio endotélio (Kimberly et al, 2003). Os nossos resultados, apesar de não serem conclusivos, parecem indicar que na população Portuguesa não há uma associação directa entre o alelo 4a do intrão 4 da eNOS e a DAC, mas para se poder confirmar estes dados é necessário aumentar o número da amostra, doentes e controlos.

A dificuldade em encontrar um bom grupo controlo, faz com que seja mais fiável realizar um estudo entre os próprios doentes, para verificar quais as diferenças genéticas que influenciam o desenvolvimento precoce e a gravidade da doença, e como estas podem ser influenciadas ou estar associadas a factores de risco modificáveis.

Assim, os estudos preliminares realizados no nosso laboratório para avaliar a possível associação do polimorfismo 4a/4b do gene eNOs com a DAC prematura, parecem indicar uma maior presença do alelo 4a (22%) em doentes jovens (menores de 45 anos) em comparação com os mais velhos (6,5% nos indivíduos maiores de 65 anos), o que coincide com os resultados obtidos num estudo da população japonesa, em que o alelo 4a da eNOS foi reportado como factor de risco independente da DAC (Yoon Y, 2000). Pelo contrário esse mesmo alelo (4a) não parece estar associado ao número de vasos lesados, independentemente da idade do doente. Talvez esta discrepância se deva, à não disponibilidade de NO afectar mais o desenvolvimento da doença, e o número de vasos lesados poder estar mais relacionado com outros factores como, outros genes que influenciam na estrutura/rigidez do endotélio, e o tempo de exposição destes doentes a factores de risco, por desconhcerem que estão a desenvolver a doença, até ao momento em que sofrem um enfarte do miocárdio e lhes é diagnosticada a doença, através de



---

cateterismo. À grande maioria dos doentes, da nossa amostra, só após sofrerem o enfarte de miocárdio, é que lhes foi diagnosticada a DAC.

Consequentemente, um número superior de estudos deve ser desenvolvido com amostras de maior tamanho e com estudos moleculares adicionais, para se clarificar o papel do polimorfismo VNTR da eNOS intrão 4 na doença coronária.

---

## 5. Bibliografia

- Ainscough EW, Brodie AM, J Chem Educ 1995, 72, 686.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 3203-7.
- Bagasra O et al. Activation of inducible form of Inducible nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 12041-5, 1995.
- Ballingad JL e Cannon PJ. Nitric oxide synthase and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. Arterioscler Thromb Vas Biol 1997; 17: 1846-58.
- Beckman JS e Koppenol WH. Nitric Oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. Am.J.Physiol, 271:C1424-37,1996.
- Behr D, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ. Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long term cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 1999; 142: 335-44.
- Berliner J e Heincke J. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic. Biol. Med. 1996; 20: 707-727.
- Bredt DS e Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 9030-3, 1989.
- Busconi L e Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. J. Biol. Chem., 268(12): 8410-3, 1993.
- Buttery LD et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. Lab. Invest., 85:75-7, 1996.
- Choi DW. Proc. Natl Acad Sci USA 1993, 90, 9741.
- Cohen RA, The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. Progress Cardiovasc Dis 38: 105-128, 1995.
- Cooke JP, Dazs VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. Annu Ver Med 1997; 48: 489-509.
- Dusse LM et al. Nitric oxide revision, 2003.
- Dusting GJ e MacDonald PS. Endogenous nitric in cardiovascular disease and transplantation. Ann. Med., 27:395-406, 1995.

- 
- Egashira K, Inou T, Hirooka Y, et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilatation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993; 88: 77-81.
  - Erhart EA, Elementos de Anatomia Humana. Pp. 121 Atheneu Editora, São Paulo 1973, 4ª Edição.
  - Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *American Heart Journal*. 2004a; 147:516-21
  - Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ, *Chem Eng News* 1933, 71, 26.
  - Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401:1-8.
  - Fleming I, Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 5-14.
  - Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
  - Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. Department of Pharmacology, Joahannes Gutenberg Universaty, Mainz, Germany. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 352: 351-64.
  - Franklin Epstein "Atherosclerosis- an inflammatory disease" *New England Journal of Medicine* 1999; 340(2):115.
  - Furchgott RF, Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endot., 401-414, Raven Press, New York 1988.
  - Furchgott R e Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-6, 1980.
  - Garthwaite J et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 172: 413-6, 1989.
  - Gewaltig MT e Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. *Cardiovas. Research*, 55:250-60, 2002.
  - Granik VG, Ryabova SY, Grigoriev NB, *Russ Chem Rev* 1997, 66, 717.

- 
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-6.
  - Hibbs JB et al. L-arginine is required for the expression activated metabolic in target cells. *J. Immunol.*, 138: 550 -65, 1987.
  - Hibbs JB et al. Nitric oxide: cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem, Biophyses, Res. Commun.*, 157: 87-94, 1988.
  - Huynh NN, Chin-Dusting. Aminoacids, arginase and nitric oxide in vascular health, *J Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(1-2):1-8~Morris, S.M.& Billiar, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am.J.Physiol.*, 266:E829-39,1994.
  - Hwang JJ, Tasi CT, Yeh HM, Chiang FT, Hsu KL, Tseng CD, et al. The 27-bp tandem repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene is not associated with coronary artery disease in a hospital-based Taiwanese population. *Cardiology* 2002; 97 : 67-72.
  - Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS; Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Auto. Nerves and Endotelium pp 427-436, Raven Press, New York 1988.
  - Ignarro LJ, Lun W. Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview, *Card Surg.* 2002; 17(4):301-6.
  - James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.*, 59(4): 533-47, 1995.
  - Katsuki SA et al. Stimulation of guanilate ciclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and compsrison to the effects of sodium azide and hydroxyamine. *J.Cyclic. Nucleotide Res.*, 3:23-5, 1977.
  - Knowles RG et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism or stimulation of the soluble guanylate cyclise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 5159-62, 1989.
  - Konturek SK, Konturek PC. Role of nitric oxide in the digestive system. *Digestion* 1995, 56: 1-13.
  - Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-5.
  - Lancaster JR; *American Scientist* 1992, 80, 248.

- 
- Lane P, Gross SS. Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 1999; 19(3):215-29.
  - Lefroy DC, Crake T, Uren NG, Davies GJ, Maseri A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation* 1993; 88: 43-54.
  - Lenhinger AL. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1986.
  - Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens* 2004; 17 : 560-7.
  - Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1113-8.
  - Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 87-104.
  - Mackaness GB, *J Exp Med* 1964, 120, 105.
  - Mackaness GB, *J Exp Med* 1969, 129, 973.
  - Mannick EE et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effects of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.*, 43: 3238-43, 1996.
  - Mardsen PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993), Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268: 17478-17448.
  - Marín J, Sánchez-Ferrer CF (1990), Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *Gen Pharmacol* 21: 575-587.
  - Marletta MA et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-11, 1988.
  - Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J.Biol.Chem.*, 268(17): 12231-4, 1993.
  - Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-30, 1994.
  - Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268 : 17478-88.

- 
- Matyar S, Attila G, Acartürk E, Akpınar O, Inal T. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. *Clinica Chimica Acta* 2005; 354: 153-58.
  - McLenachan JM, Vita JA, Fish RD, et al. Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points. *Circulation* 1990; 82: 1169-73.
  - Mendes-Ribeiro AC, Brunini TMC, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and HF. *Cardiovasc Res* 2001; 49:697-712.
  - Miyazaki H, Matsouka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:1141-6.
  - Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PG12) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977; 11: 323-44.
  - Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews* 1991; 43:109-42.
  - Moncada S et al. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.* 37:2495-501, 1988.
  - Mountcastle VB, *Fisiologia Médica – Volume I*, 153-223, Editora Guanabara Koogan SA, 1974, 13ª Edição.
  - Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 1027-33.
  - Nava E e Lüscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypert.*, 13(suppl. 2): S39-48, 1995.
  - Oemar Bs, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97: 2494-8.
  - Palmer RMJ, Ferrige Ag, Moncada S (1987); Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing. *Nature* 327, 524-526.
  - Palmer RMJ, Ashton DS e Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-6, 1988.
-

- 
- Pyörälä K, De Backer G, Graham I, Poole-Wilson P, Wood D. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. *Atherosclerosis*. 1994; 110:121-161.
  - Radomski MW et al. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5193-7, 1990.
  - Radomski MW et al. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 181-7, 1987.
  - Rapoport RM e Murad F. Agonist induced endothelium- dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *cisc. Res.*, 52:352-7, 1987.
  - Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-8.
  - Rees DD et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 746-52, 1990.
  - Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340:115-26.
  - Ross R. Cell Biology of Atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57:791-804.
  - Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990. *Nature*. 1993; 362:801-809.
  - Rubanyi GM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46: 27-36, 1991.
  - Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(suppl 4): S1-S4.
  - Schmidt HHHW e Walter U. NO at work. *Cell*, 78: 919-25, 1994.
  - Scott-Burden T e Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*, 87(suppl. 5): 51-5, 1993.
  - Shepherd J. Tomorrow's world: atherosclerosis in the year 2000 *Neth. J. Med.* 1997; 50:221-7.
  - Sigusch HH, Suber R, Lehmann MH, Surber S, Weber J, Henke A, et al. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron4 of endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 60: 22.

- 
- Snyder SH e Bredt DS Biological roles of nitric oxide. Scientific American may: 68-77, 28-35, 1992.
  - Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. Eur. Heart. J. 1990; 11 Suppl E: 3-19.
  - Szabó, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. New Horizons, 3(1): 2-32, 1995.
  - Ulf Landmesser MD, Burkhard Hornig MD, Helmut Drexler MD. Endothelial Dysfunction in Hypercholesterolemia: Mechanisms, Pathophysiological Importance, and Therapeutic Interventions Semin Thromb Hemost 2000; 26: 529-538.
  - Ursell PC, Mayes M. Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart. Int J Cardiol 1995; 50: 217-23.
  - Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. Lancet 1989; 2: 997-1000.
  - Vane JR, Änggård EE, Botting RM (1990), Regulatory functions of the vascular endothelium. New Engl J Med 323: 27-36.
  - Vasta V et al. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. Bioch. Biophys. Res. Commun., 206(3): 878-84, 1995.
  - Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, et al. Genetic contribution of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17 : 3147-53.
  - Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. Nat Med 1996; 2: 41-45.
  - Wang Y, Mardsen PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. Adv Pharmacol 1995; 34: 71-90.
  - Weenmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. J.Int Med., 235: 317-27, 1994.
  - Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. Arterioscler. Thromb. Vasc Biol 1997; 17: 2479-88.
  - Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signalling systems. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20: 1430-42, 1994.



- 
- Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Ann Rev Med* 47: 315-331,1996.
  - Wu L, Champlain J. Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats. *Hypertension* 1999; 34: 1247-1253.
  - Xu W, Charles I, Moncada S, Gorman P; Liu L, Emson P. Chromosomal assignment of the inducible NOS gene and endothelial NOS gene to human chromosome 17p 11-17p 11 and chromosome 7, respectively. *Endothelium* 1: S24 (abstr), 1993.
  - Xu W, Gorman P, Sheer D, Bates G, Kishimoto J, Lizhi L, Emson P. Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1), to 12q 24.2->24. 31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogene Cell Genet* 64: 62-63,1993.
  - Yashimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spam in the Japanese. *Hum Genet* 1998; 103: 65-9.
  - Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000; 46: 1626-30.

## **Anexo**

Nº processo
-------------

Data
------

NºAmostra
-----------

Sexo
Fem
Masc

Idade
-------

Peso
------

Altura
--------

Hipertensão
Sim
Não

Diabetes
Sim
Não

Dislipidemia
Sim
Não

Exercício físico
Sim
Não

Fumador	Anos
Sim	
Não	
Nunca	

História familiar
Sim
Não
Desconhece

Idade
Diag da doença
Anos
Desconhece

Menopausa	trat hormonal
Sim	
Não	

Gravidade da doença

Cirurgia/ Angiopastia

Medicação

Obs

Tomei conhecimento do estudo e aceito participar
--